



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CUATRO POBLACIONES DE OVINOS CRIOLLOS DE ARGENTINA

GENETIC CHARACTERIZATION OF FOUR POPULATIONS OF ARGENTINIAN CREOLE SHEEP

Peña S.^{1,5*}, Martínez A.², Villegas Castagnasso E.³, Aulicino M.^{1,4}, Género E.R.^{1,5}, Giovambattista G.³, Martínez R.D.^{1,5}

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Argentina.

²Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España.

³IGEVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

⁴IFSC, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de La Plata, Argentina.

⁵IIPAAS, Instituto de Investigación Agropecuaria, Ambiente y Salud, FCA-UNLZ, Argentina.

*Autor correspondiente: sabp03@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Creole sheep are the founders of sheep farming in Argentina and have contributed in a sustained way to the economic, social and cultural development of some regions of this country. However, it is a scarcely valorised and poorly studied genetic resource. In order to genetically characterize the Argentinian Creole sheep, DNA samples were taken from four representative populations located in the provinces of Buenos Aires, Corrientes, Santiago del Estero and Salta. These flocks were selected because they are considered to be conserved groups, they have the phenotypic characteristics of the creole breed and there are no records about the introduction of animals of other breeds into those systems. A total of 30 microsatellites and the D-loop region of mitochondrial DNA were analysed. Microsatellite analysis showed high level of genetic diversity within populations ($H_o = 0.676$; $H_e = 0.685$; $PIC = 0.713$). This variability is explained by differences between molecular patterns of the studied individuals, which can be classified into three significantly different population groups: BA, SA, SE+CO. Since these populations explain very little of the total variability (7.6%), it can be considered that they belong to a same race. The analysis of the mitochondrial D-loop showed that Argentinian Creole sheep have haplotypes belonging to the Asian haplogroup, which is widely distributed in the Spanish breeds, which are considered to be their ancestors. The results obtained in the present study will provide information to develop management criteria for this genetic resource in Argentina, in order to implement their conservation, recovery and/or to develop breeding programs.

Key words: Sheep, genetic variability, microsatellites, mitochondrial DNA

RESUMEN

Los ovinos criollos son los fundadores de la ganadería ovina en la Argentina y han contribuido de manera sostenida al desarrollo económico, social y cultural de algunas regiones del país. A pesar de ello, es un recurso zoogenético escasamente valorizado y por ende poco estudiado. En orden de caracterizar genéticamente a los ovinos criollos argentinos, se tomaron muestras de ADN de cuatro poblaciones representativas localizadas en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Santiago del Estero y Salta. Estas majadas se seleccionaron por ser grupos conservados, que presentan las características fenotípicas de la raza y no registran la introducción de animales de otras razas en el sistema de reproducción. Un total de 30 marcadores microsatélites y la región D-loop del ADN mitocondrial fueron analizados. El análisis de los microsatélites permitió evidenciar una alta diversidad genética intrapoblacional ($H_o = 0,676$; $H_e = 0,685$; $PIC = 0,713$). Dicha variabilidad es explicada por diferencias entre los patrones moleculares de los individuos estudiados que pueden clasificarse en 3 grupos de poblaciones significativamente diferentes: BA, SA, SE+CO. Dado que dichas poblaciones explican muy poco de la variabilidad total (7,6%), ellas deberían considerarse perteneciente a una misma raza. El análisis del D-loop mitocondrial demostró que los individuos analizados están relacionados con el haplogrupo asiático, el cual está ampliamente distribuido en las razas españolas que son las antecesoras de la raza criolla argentina. Los resultados obtenidos en este trabajo proveerán información para establecer criterios de manejo de este recurso genético de Argentina con el fin de implementar planes de conservación, recuperación y/o mejora de los programas.

Palabras clave: Ovejas, variabilidad genética, microsatélites, ADN mitocondrial

Fecha de recepción: 30/12/2016

Fecha de aceptación de versión final: 23/11/2017

INTRODUCCIÓN

Los ovinos criollos son los fundadores de la ganadería ovina en la Argentina y han contribuido de manera sostenida al desarrollo económico, social y cultural de las más diversas regiones de este país. En cuanto a su número actual conforman la tercera agrupación racial (7,6%) del total nacional, con una amplia distribución que abarca la mayoría de las provincias (Lynch *et al.*, 2009).

Los primeros ovinos ingresaron a América en el segundo viaje de Colón, procedentes de Andalucía y probablemente también de Canarias. Estas poblaciones no eran razas definidas ni estaban identificadas como se lleva a cabo hoy en día. De ellas, sólo se describía su ubicación geográfica o excepcionalmente el color (Rodero *et al.*, 1992). Posteriormente, en 1535 Mendoza y Ayolas introducen ovinos en Argentina directamente desde Sevilla y en 1548 Nuflo de Chavez ingresa ovejas y cabras desde el Perú (Rodero *et al.*, 1992; Giberti, 1970). Más tarde continuaron ingresando ovinos al territorio nacional, principalmente por Perú, y se diseminaron entre las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Corrientes (Zeballos, 1898). Por lo tanto, se debe considerar que los ovinos criollos son los descendientes directos de aquellos animales que ingresaron con los colonizadores españoles. En su evolución histórica han tenido una primera etapa de gran crecimiento y dispersión hasta principios del siglo XIX. En el año 1825, comienzan a introducirse en el país diferentes razas australianas, españolas e inglesas con el propósito de mejorar la producción lanera nacional, por lo que en Buenos Aires comienzan los primeros cruzamientos con merinos puros importados (Zeballos, 1898). Este hecho se da por la demanda de lanas finas para satisfacer las industrias europeas durante las décadas de 1830 y 1840 (Carrazzoni, 1997). Este proceso de mestización se intensificó con el tiempo, principalmente en las majadas más numerosas, siendo absorbido paulatinamente el ovino criollo por las razas introducidas. A partir de 1880, las ovejas entraron en la Patagonia por el sur llevadas por súbditos británicos que en su mayor parte eran de origen escocés, y más al norte, en la llanura pampeana, las ovejas fueron difundidas por colonos irlandeses a partir de 1840 (Coronato, 2010). Además, de forma concomitante a su absorción genética, los ovinos criollos han sido objeto de calificativos prejuiciosos que menoscabaron su verdadera potencialidad productiva (Martínez, 2015). Sin embargo, debido a su adaptación a los distintos ambientes de

nuestro país y a las ventajas productivas valoradas por los pequeños y medianos productores locales, el ovino criollo actualmente está siendo revalorizado en diversas regiones, como por ejemplo en la Patagonia (Lanari *et al.*, 2012), el oeste formoseño (De la Rosa *et al.*, 2012) y Córdoba (De Gea y Levrino, 2000), aunque todavía la información existente sobre este importante recurso animal es muy limitada (Mueller, 2005).

Los marcadores genéticos de tipo microsatélites han sido de gran utilidad para la caracterización genética de razas ovinas debido a su alto nivel de polimorfismo, su amplia distribución en el genoma, y por el hecho de contar con paneles de marcadores estandarizados (Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012; Agaviezor *et al.*, 2012). También, permiten analizar las relaciones genéticas entre poblaciones (Peter *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2012; Kijas *et al.*, 2012). Por su parte, el ADN mitocondrial (ADNmt) es utilizado para el análisis de los linajes maternos, dado que se transmite a la progenie a través de la madre (San Primitivo *et al.*, 2007). Además, no presenta recombinación y tiene una tasa de mutación elevada y relativamente constante. Actualmente cinco haplogrupos mitocondriales han sido descritos en el ovino doméstico (*Ovis aries*), los que han sido denominados como A, B, C, D y E (Meadows *et al.*, 2007). A pesar que estos dos tipos de marcadores genéticos han sido empleados para caracterizar numerosas razas ovinas, hasta la actualidad, no han sido empleados para el estudio de poblaciones criollas de Argentina. El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar genéticamente cuatro poblaciones de ovinos criollos ubicadas en distintas regiones geográficas de Argentina, utilizando un panel de 30 microsatélites y la región D-loop del ADNmt. La realización de este estudio permitirá contar con información para establecer criterios de manejo genético de este valioso recurso animal, aportando al diseño de estrategias en la elaboración de planes de conservación, recuperación y/o mejora de las poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Los ovinos criollos en Argentina no cuentan en la actualidad con registros genealógicos formales, ni con una asociación de criadores que avale o certifique la pertenencia de los animales a ésta agrupación racial. Es por esta razón que en el presente estudio se establecieron los siguientes criterios de

muestreo: i- la información proporcionada por sus criadores; ii- el aislamiento reproductivo (disminuye la probabilidad de mestización); y iii- el tamaño de la majada (permite un muestreo más representativo). La información de los criadores fue la principal herramienta en la definición y elección de las poblaciones a estudiar. Ellos han brindado el origen y la historia evolutiva de sus majadas e identificado los animales con las características fenotípicas correspondientes a las ovejas criollas. Los motivos de descarte para la conformación de los grupos de estudio fueron principalmente: a) introducción a la majada de algún reproductor de otra raza; b) la ausencia en la majada de carneros criollos; c) desconocimiento por parte del criador del origen de la majada. Por sus antecedentes, características reproductivas y diversidad de ambientes, se seleccionaron majadas localizadas en cuatro provincias: Salta (SA) con tres majadas, ubicadas en las localidades de Iruya y Pueblo Viejo ($22^{\circ}47'27''$ S, $65^{\circ}13'7''$ O), pertenecientes a familias de pueblos originarios collas (2.800 msnm); Santiago del Estero (SE), con tres majadas de pequeños productores ubicados en el Departamento Figueroa ($27^{\circ}42'32''$ S, $63^{\circ}46'25''$ O); Corrientes (CO), con una majada de aproximadamente 200 ovejas de un núcleo cerrado y mantenido como reserva por un criador de la zona de Sauce ($30^{\circ}5'9''$ S, $58^{\circ}47'14''$ O) y Buenos Aires (BA) con una majada numerosa (aproximadamente 800 ovejas) que se mantienen en núcleo cerrado en la localidad de 25 de Mayo, en la estancia La Juanita ($35^{\circ}25'00''$ S, $60^{\circ}10'00''$ O).

En total, se tomaron ciento veinte muestras de sangre entera de ovejas criollas adultas (4 a 6 dientes según cronometría dentaria), que no compartían madre entre ellas, a las que se les adicionó anticoagulante. De cada una de las poblaciones mencionadas se analizaron 30 muestras.

Análisis molecular

Para el análisis de los microsatélites se extrajo el ADN de las muestras de sangre utilizando el kit ADN *Gen Elute Kit Genomic Blood* (Sigma Aldrich). La caracterización genética a nivel autosómico se realizó utilizando el panel de 30 microsatélites recomendado por la FAO para realizar estudios de variabilidad genética en ovinos (<http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>). Dicho panel incluye los siguientes marcadores: BM1824, BM6506, BM6526, CSRD247, CSSM66, D5S2, ETH010, ETH225, HSC, ILST011, INRA35, INRA63, MA065, MAF209, MAF214, McM527, OarAE0129, OarCP20, OarCP34, OarCP49, OarFCB011, OarFCB020, OarFCB048, OarFCB304, RM006, SPS113, SPS115, TGLA053, TGLA122 y TGLA126.

Los productos de amplificación generados por la PCR, fueron analizados mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador ABI 377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La asignación de los genotipos para los diferentes microsatélites se llevó a cabo utilizando el programa Gene Mapper versión 4.0 (Applied Biosystems) y el marcador interno LIZ 500 (500 pb). La genotipificación de los microsatélites se realizó en el laboratorio de genética molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, España.

Para el análisis de los matrilineajes se utilizó la región control del *D-loop* mitocondrial de 15 muestras de cada población de forma aleatoria. La extracción de ADN se realizó por el método orgánico a partir de las muestras de sangre, y los amplicones se obtuvieron utilizando los cebadores externos reportados por Hiendleder *et al.* (1998). Para la reacción de amplificación se emplearon los cebadores internos directos y reversos BGD y H3C (Pedrosa *et al.*, 2006).

Análisis poblacional

A partir de los genotipos se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética en la totalidad de los *loci* microsatélites: Número de alelos totales (N_{at}), Número de alelos por locus para cada población (N_p), Número de alelos efectivos (A_e), Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), el Contenido de Información Polimórfica (PIC) para cada marcador se estimó con el programa Excel Microsatellite Toolkit V3.1.1 (Park, 2001).

Las desviaciones del equilibrio Hardy Weinberg (HW) se estimaron utilizando las pruebas exactas que emplean Montecarlo vía cadenas de Markov, incluidas en el programa estadístico Genepop 4.2 (Rousset, 2008). La estructura de las poblaciones se estudió por los estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) según lo propuesto por Weir y Cockerham (1984). La estructura de la población y el grado de mezcla se estimaron mediante el modelo de agrupación Bayesiano del programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Según lo sugerido por varios autores, el análisis incluyó un modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas (Pritchard *et al.*, 2000; Zuccaro *et al.*, 2008). El número más probable de agrupaciones o K poblaciones presentes en el conjunto de datos se calculó con el algoritmo ΔK propuesto por Evanno *et al.* (2005). Para establecer gráficamente las relaciones genéticas entre las poblaciones se empleó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), que permitió clasificar los 120

individuos pertenecientes a las 4 poblaciones a través de la totalidad de los alelos de los diferentes loci estudiados. El AFC se realizó mediante el *software* Genetix (Belkhir *et al.*, 2004). Para estudiar la estructura genética poblacional, se aplicó el análisis molecular de la varianza (AMOVA), utilizando el programa Arlequin, versión 2000 (Schneider *et al.*, 2000). En organismos diploides la información de cada genotipo consiste en dos alelos por locus, consecuentemente, durante la construcción de la matriz de datos moleculares cada genotipo posee dos filas (una para cada alelo), por lo tanto, el número de datos se duplica (2N). La Suma de Cuadrados (SC) total fue particionada en “SC entre Poblaciones” y “SC dentro de poblaciones” con los grados de libertad P-1 y 2N-P respectivamente, siendo P: número total de poblaciones y N: número total de individuos. Las varianzas para cada fuente de variación fueron estimadas a partir de las esperanzas matemáticas de los CM, y sus porcentajes relativos se calcularon dividiendo cada una de ellas por la varianza total. Para estimar el nivel de significancia se usaron permutaciones aleatorias (10.000) de los genotipos entre las muestras (*Jackknifing*) (Excoffier *et al.*, 1990). Para el análisis de las secuencias obtenidas del D-loop mitocondrial se utilizó el programa Chromas Pro. El análisis de similitud se realizó mediante los programas CLUSTALW2 y ARLEQUIN, incluyendo en este análisis los haplogrupos nodales ovinos relacionados con el origen de los ovinos que ingresaron al continente americano (A, B y C).

RESULTADOS

Variabilidad de la población

En la población total de ovinos criollos analizada se detectó un total de 294 variantes alélicas en los treinta marcadores microsatélites tipificados. La población con mayor número de alelos (Na) fue CO= 226, la menor BA= 172 e intermedias SA= 201 y SE= 185. La media general de alelos por locus (Nam) fue de 9,8; mientras que el Nam por población siempre registró valores inferiores a la media general: CO= 7,53; SA= 6,70; SE= 6,16 y BA= 5,73. Esta particularidad puede explicarse porque todas las poblaciones presentaron alelos privativos o únicos (Ap), en el siguiente orden CO= 31; SA= 15; BA= 14 y SE= 9. También CO mostró el mayor número de alelos efectivos (Ae) (CO= 4,078; SA= 4,036; SE= 3,856 y BA= 3,193). El microsatélite ETH010 fue el que presentó el menor número de alelos (Na= 3)

en el total de las poblaciones, mientras que el marcador OarCP49 presentó el mayor número de variantes (Na= 21). BA mostró todos los alelos presentes en los loci BM1824 (Na= 5), ETH10 (Na= 3) y OarAE0129 (Na= 7), CO tuvo todos los alelos presentes en los loci BM1824 (Na= 5), D5S2 (Na= 5) y McM527 (Na= 7), SE mostró todos los alelos presentes de BM1824 (Na= 5) y SA no presentó la totalidad de los alelos en ninguno de los marcadores analizados.

La Tabla 1, muestra la Heterocigosidad Observada (Ho), la Heterocigosidad Esperada (He) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) por *loci* y por población. De los 30 marcadores microsatélites tipificados, 24 presentaron valores mayores a 0,50 mostrando la utilidad de los mismos para analizar diversidad genética, ya que son altamente informativos. El marcador con mayor contenido de información polimórfica fue el TGLA053 (PIC= 0,877) y los de menor valor ETH010 (PIC= 0,148) y MAF214 (PIC= 0,444). Los valores encontrados de Ho variaron entre 0,067 para el marcador ETH010 en CO y 0,967 para los marcadores McM527 y OarFCB048 en CO y SA, respectivamente. En el caso de la He, los valores obtenidos oscilaron entre 0,064 para el marcador ETH010 en CO y 0,88 para el marcador OarCP49 en SE.

Todas la poblaciones presentaron loci con desequilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) ($p < 0,05$): BA= 2 (OarCP20; OarFCB304), SE= 6 (OarAE0129; OarCP20; TGLA126; ILSTS01; INRA35; SPS115) y las de mayor número fueron CO y SA= 9 (CSR0247; CSSM66; ETH225; OarAE0129; OarCP20; OarFCB011; OarFCB048; SPS113; TGLA126) y (CSSM66; OarAE0129; OarFCB011; TGLA126; BM1824; BM6506; BM6526; CSR0247; OarFCB304), respectivamente. Ningún marcador presentó desequilibrio simultáneamente en las cuatro poblaciones. El valor de Fis multilocus (índice de fijación de Wright), que describe el déficit de heterocigotas de la población, fue de 0,0305 (desde -0,008 hasta 0,069), valor bajo y con un intervalo que incluye el cero, lo que indica que en promedio la distribución de los genotipos no se aleja del equilibrio H-W. La población con mayor diversidad genética resultó CO, presentando mayor heterocigosis y menor valor Fis, en segundo lugar se ubicó SA, mientras que SE y BA presentaron menores valores de heterocigosidad y mayores valores de Fis, lo que indicaría una menor variabilidad genética, debido quizás a un incremento de la homocigosis por fijación de alelos o endogamia. Sin embargo, los FIS calculados para las poblaciones estudiadas pueden ser considerados bajos en general (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros poblacionales para cada microsatélite.

Locus	PIC	Población							
		CO		SE		SA		BA	
		Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
BM1824	0,719	0,724	0,738	0,68	0,753	0,5	0,626	0,552	0,688
BM6506	0,674	0,667	0,701	0,621	0,625	0,633	0,746	0,714	0,625
BM6526	0,727	0,8	0,757	0,7	0,674	0,7	0,566	0,767	0,766
CSR247	0,707	0,5	0,731	0,75	0,751	0,64	0,671	0,69	0,656
CSSM66	0,847	0,931	0,876	0,667	0,713	0,586	0,807	0,759	0,764
D5S2	0,633	0,75	0,678	0,63	0,698	0,643	0,621	0,633	0,61
ETH010	0,149	0,067	0,064	0,167	0,153	0,133	0,124	0,3	0,265
ETH225	0,528	0,567	0,525	0,379	0,432	0,759	0,708	0,567	0,527
HSC	0,832	0,852	0,805	0,786	0,768	0,852	0,849	0,793	0,732
ILSTS01	0,698	0,619	0,642	0,714	0,729	0,704	0,75	0,643	0,719
INRA35	0,791	0,867	0,797	0,667	0,796	0,862	0,754	0,759	0,651
INRA63	0,747	0,733	0,743	0,481	0,607	0,962	0,804	0,821	0,652
MA065	0,74	0,767	0,716	0,731	0,73	0,933	0,667	0,733	0,777
MAF209	0,769	0,759	0,699	0,759	0,744	0,929	0,78	0,69	0,76
MAF214	0,444	0,5	0,471	0,433	0,391	0,467	0,562	0,3	0,263
McM527	0,731	0,967	0,824	0,867	0,802	0,8	0,651	0,733	0,563
OarAE0129	0,652	0,533	0,614	0,19	0,499	0,379	0,551	0,667	0,688
OarCP20	0,711	0,448	0,69	0,5	0,774	0,633	0,669	0,12	0,254
OarCP34	0,642	0,7	0,654	0,621	0,64	0,759	0,735	0,567	0,641
OarCP49	0,873	0,867	0,874	0,897	0,88	0,828	0,872	0,655	0,763
OarFCB011	0,758	0,931	0,766	0,833	0,778	0,767	0,768	0,517	0,561
OarFCB020	0,81	0,867	0,86	0,667	0,624	0,926	0,818	0,724	0,757
OarFCB048	0,77	0,833	0,719	0,759	0,674	0,967	0,832	0,8	0,814
OarFCB304	0,837	0,733	0,725	0,862	0,851	0,897	0,832	0,643	0,661
RM006	0,637	0,679	0,67	0,63	0,627	0,69	0,646	0,552	0,546
SPS113	0,703	0,633	0,709	0,7	0,628	0,786	0,753	0,7	0,705
SPS115	0,772	0,931	0,814	0,833	0,788	0,769	0,765	0,759	0,765
TGLA053	0,878	0,821	0,807	0,897	0,878	0,867	0,873	0,821	0,793
TGLA122	0,758	0,759	0,822	0,5	0,692	0,417	0,614	0,5	0,556
TGLA126	0,853	0,633	0,747	0,52	0,845	0,462	0,76	0,517	0,747

PIC: Contenido de Información Polimórfica; H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

Tabla 2. Indicadores de diversidad genética por población.

Población	H _e	H _o	F _{is}
CO	0,715	0,708	0,00835 (-0,05573 – 0,04374)
SE	0,648	0,685	0,07264 (0,01056 – 0,10591)
SA	0,708	0,706	0,01470 (-0,03601 – 0,05084)
BA	0,633	0,642	0,03180 (-0,02844 – 0,05222)
Promedio	0,676	0,685	0,03048 (-0,00782 – 0,06862)

H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

Estructuración Poblacional

Para estimar la distancia entre las poblaciones se construyó la matriz de distancias genéticas entre las cuatro poblaciones, utilizando el parámetro FST (Tabla 3). Las poblaciones CO y SE fueron las que presentaron menor distancia genética (0,033), mientras que las más alejadas fueron BA y SE (0,104) y BA con SA (0,098). BA fue la población más diferente del resto de las regiones. En concordancia con la matriz de distancias genéticas, el AFC permitió identificar a las poblaciones más distanciadas del centro de coordenadas del *biplot* como las más divergentes. Además, el *biplot*, construido con el primer y segundo eje, explicó un alto porcentaje de la variabilidad total (75%). La Figura 1, muestra a CO y SE como las más próximas entre sí, mientras que BA y SA se mantuvieron como grupos separados. El *biplot* demostró la existencia de un arreglo poblacional particular, los individuos pertenecientes a una población siempre se agruparon juntos y no se mezclaron con individuos de otra población, a excepción de las poblaciones CO y SE, cuyos individuos se solaparon (Figura 1). Por lo tanto, se pudo comprobar gráficamente la existencia de 3 grupos; CO+SE (Centro), SA (Norte) y BA (Sur).

Por otra parte, la aplicación del modelo bayesiano, de acuerdo al método propuesto por Evanno *et al.* (2005) reveló un número esperado de *clusters* (K) entre 1 y 6. En este análisis se asumió que K= 4, ya que resultó ser el número de poblaciones que se diferenciaron en función de la variabilidad genética encontrada (Figura 2). La población de Buenos Aires resultó ser la más distante de acuerdo a su

composición genética en relación con las otras poblaciones analizadas. Al aumentar el K, se fue diferenciando primero con la población Salteña y subsiguientemente con las poblaciones de Corrientes y Santiago del Estero.

Para definir la estructura poblacional, se utilizaron dos análisis moleculares de la varianza (AMOVAS). El primero, consideró las cuatro poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y se estimó particionando la diversidad genética total en “SC entre poblaciones” y “Suma de Cuadrados dentro de poblaciones”. Posteriormente, se computó un segundo AMOVA, estructurando los datos en función del AFC, el número de *clusters* esperado y la matriz de distancia genética (FST). Entonces se consideraron tres grupos de poblaciones o Regiones: 1- Buenos Aires (Sur); 2- Salta (Norte); 3- Corrientes + Santiago del Estero (Centro). En el modelo jerárquico, la “SC entre poblaciones” considerada en el primer modelo se particionó en: “SC entre Regiones” y “SC entre Poblaciones dentro de Regiones” (Schneider *et al.*, 2000). El AMOVA (sin estructura) mostró diferencias significativas entre las cuatro poblaciones. Sin embargo, el porcentaje de variación que explicó dicha fuente fue sólo del 7,6%, mientras que la mayor variabilidad se expresó “dentro de poblaciones” con un porcentaje del 92,5% (Tabla 4-a). El AMOVA (con estructura) mostró diferencias significativas entre grupos (regiones) y dentro de poblaciones, pero las poblaciones dentro de los grupos no fueron diferentes, señalando que Corrientes y Santiago pueden ser consideradas integrantes de una misma población (Centro). La máxima variabilidad

también fue explicada por la fuente de variación “dentro de poblaciones” (Tabla 4-b).

Análisis de los Linajes Maternos

En el caso del análisis del D-loop mitocondrial, las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos públicas de secuencias nucleotídicas utilizando el algoritmo BLAST. Esto permitió determinar su identidad con los haplotipos ovinos previamente reportados para el D-loop mitocondrial. Posteriormente, se realizó el

alineamiento de las secuencias empleando el programa DNAMAN versión 5.2.10 (Lynnon BioSoft, Quebec, Canadá) y se completó el análisis con las secuencias consensos representativos de los haplogrupos A, B y C. Estos haplogrupos se diferencian entre sí en siete sitios polimórficos (Tabla 5). Las muestras analizadas pertenecen al haplogrupo A, de origen asiático. Por su parte, durante el análisis de las secuencias propias se encontró un sitio polimórfico nuevo que se presentó en el 68% de los animales analizados.

Tabla 3. Matriz de distancia genética entre las poblaciones utilizando el método de diferentes alelos (Fst).

	CO	SE	SA	BA
CO	0,00000			
SE	0,03273	0,00000		
SA	0,06493	0,07156	0,00000	
BA	0,07989	0,10414	0,09821	0,00000

PIC: Contenido de Información Polimórfica; H_o: Heterocigosidad Observada; H_e: Heterocigosidad Esperada; CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires.

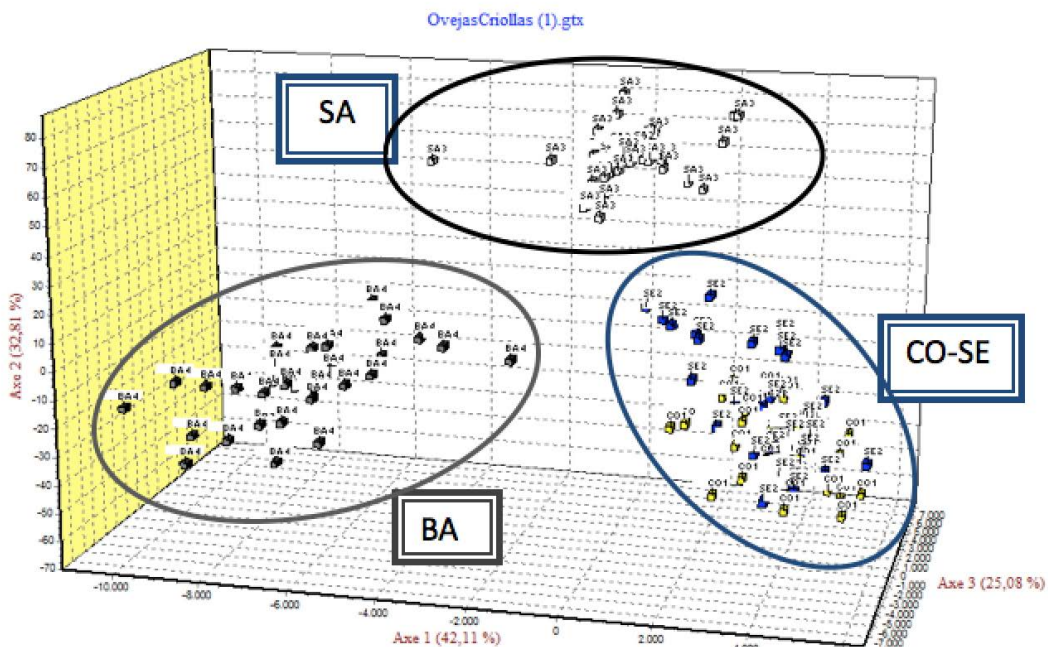


Figura 1. Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples (AFC) entre los individuos de las diferentes poblaciones (CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires).

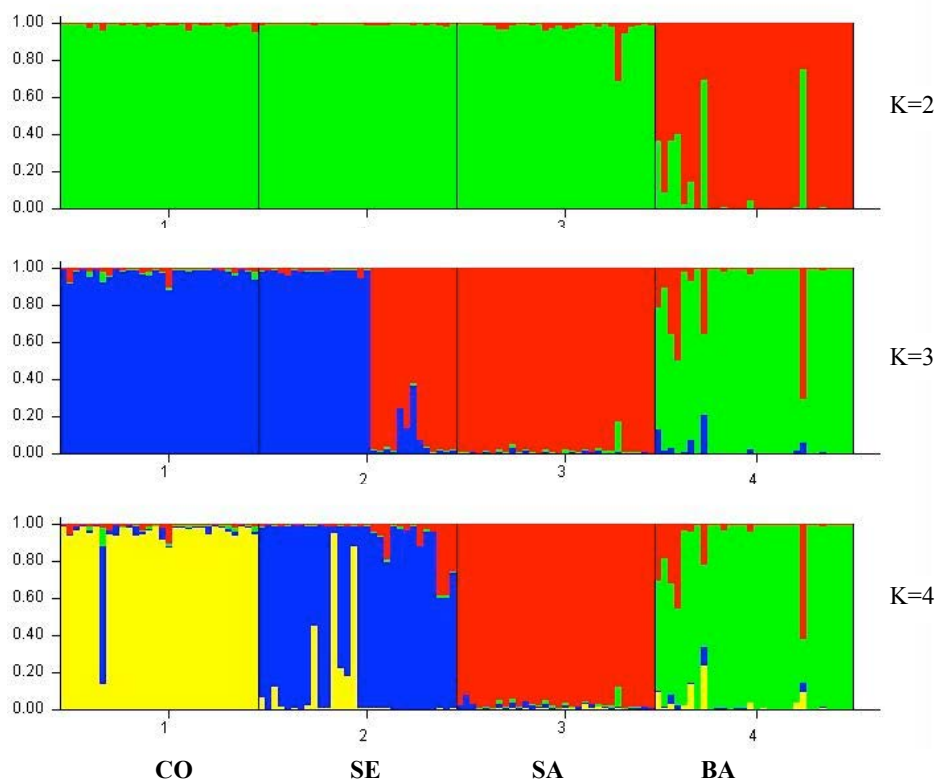


Figura 2. Estructura poblacional analizada por STRUCTURE para las poblaciones. (CO: Corrientes; SE: Santiago del Estero; SA: Salta; BA: Buenos Aires) con los valores de K= 2, 3 y 4.

Tabla 4. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA); a- Análisis sin estructura poblacional; b- Análisis con estructura poblacional.

Fuentes de variación	gl ⁽¹⁾	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	p ⁽²⁾	Porcentaje de variación
a					
Entre poblaciones	3	105,71	0,49 (Va)	<0,01	7,55
Dentro de poblaciones	236	1.411,05	5,98 (Vc)		92,45
Total	239	1.516,82	6,47 (Vt)		
b					
Entre regiones (Norte-Centro y Sur)	2	87,48	0,98 (Va)	<0,01	5,2
Entre poblaciones dentro de regiones	1	18,3	0,32 (Vb)	0,16	3,15
Dentro de Poblaciones	236	1.411,05	10,16 (Vc)	<0,01	91,65
Total	239	1.516,82	11,46 (Vt)		

⁽¹⁾Grados de libertad; ⁽²⁾Nivel de probabilidad; (Va): Varianza debida a diferencias entre genotipos de diferentes poblaciones; (Vb): Varianza debida a diferencias entre genotipos de diferentes poblaciones dentro de una región; (Vc): Varianza debido a diferencias entre genotipos dentro de una población; (Vt): Varianza molecular total.

Tabla 5. Sitios polimórficos que permiten analizar los Haplogrupos A, B y C, como los sitios analizados en las poblaciones locales.

HAPLOGRUPO/ POBLACIÓN	POSICIÓN							
	16250	16258	16285	16471	16482	16495	16576	16646
Haplogrupo A	C	C	A	C	G	G	C	C
Haplogrupo B	T	T	A	C	A	A	C	T
Haplogrupo C	T	T	A	T	A	A	T	T
Poblaciones Locales	C	C	G	C	G	G	C	C
Poblaciones Locales	C	C	A	C	G	G	C	C

DISCUSIÓN

Considerando que se han estudiado cuatro poblaciones pertenecientes a una sola agrupación racial, involucrando en total a 120 individuos (30 por población), el número total de alelos encontrado ha sido relativamente alto (294). Esto estaría indicando que a pesar de la reducción en el número de ovinos criollos, éstos aún conservan un alto grado de variabilidad, lo cual puede dimensionarse adecuadamente si observamos que en un estudio sobre 1675 ovejas pertenecientes a 52 razas del norte de Eurasia se describieron en total 342 variantes alélicas (Tapio *et al.*, 2010). Para la caracterización molecular hemos utilizado un elevado número de microsatélites (30) si se compara con otros trabajos que utilizaron 11 y 12 marcadores para caracterizar 11 razas ovinas de Colombia y seis razas Pireánicas, respectivamente (Ocampo *et al.*, 2016; Ferrando *et al.*, 2014). El rango encontrado de alelos por marcador fue de 3 a 21, el primero asociado al microsatélite ETH010 y el segundo a OarCP49. Para ETH010 se han reportado un mayor número de variantes, como por ejemplo en las razas ovinas de las Islas Baleares donde fueron descritas siete (Pons *et al.*, 2015). El número de variantes encontradas para OarCP49 coincidió con el número reportado para el ovino criollo Pantaneiro (Crispim *et al.*, 2014) y ambos se diferenciaron de la raza ovina Xisqueta donde el número de variantes para este marcador fue sustancialmente menor ($N_a = 8$) (Avellanet Torres, 2006). El número medio de alelos y la heterocigosidad son los parámetros más usuales

en la evaluación de la diversidad genética. El número medio de alelos en la población total ($N_{am} = 9,8$) puede considerarse alto si lo comparamos con los resultados obtenidos para 11 razas ovinas austríacas que mostraron los siguientes valores: Alpines Steinschaf= 9,43; Texel= 6,19; Montafoner Steinschaf= 7,10; Krainer Steinschaf= 7,38; Kärntner Brillenschaf= 8,71; Waldschaf= 10,71; Zackelschaf= 7,81; Tiroler Steinschaf= 6,19; Braunes Bergschaf= 8,62; Tiroler Bergschaf= 7,95; y Juraschaf= 7,57 (Baumung *et al.*, 2006). La población CO resultó la más diversa debido a que registró mayor número de alelos ($N_a = 226$), con mayor número de alelos privativos ($A_p = 31$), mayor heterocigosidad ($H_e = 0,715$) y menor endogamia ($F_{IS} = 0,008$). La población SA también resultó tener alta variabilidad genética, mientras que BA resultó ser la población menos diversa con $N_a = 172$, $A_p = 14$ y $H_e = 0,633$. La matriz de distancia genética demostró que los grupos más alejados entre sí fueron SE y BA ($F_{ST} = 0,10414$) y en segundo lugar SA y BA ($F_{ST} = 0,098$), mientras que los grupos más parecidos entre sí fueron SE y CO ($F_{ST} = 0,033$). Coincidentemente con la matriz de distancia, el AFC definió tres grupos de individuos: SA (Norte), BA (Sur) y CO+SE (Centro), ubicando a las poblaciones BA y SE en los extremos opuestos del primer eje del *biplot* (que explica el mayor porcentaje de inercia total), permitiendo inferir que ambas poblaciones son las que más divergen en sus frecuencias alélicas. La población SA se halla alejada de las restantes poblaciones sobre el segundo componente, esto podría explicarse por su estructura y diversidad

diferencial relacionada a una variabilidad genética media, un índice de diversidad alto y la existencia de un exceso o déficit de heterocigotas especialmente en aquellos *loci* que presentaron ausencia de desequilibrio en las otras poblaciones. Sin embargo, las divergencias entre regiones podrían atribuirse a que las poblaciones se encuentran adaptadas a ambientes particulares. Esto explicaría porque a distancias mayores se observaron mayores diferencias genéticas, siendo una de las posibles causas una reducción en el flujo génico (Wright, 1943). Aunque los marcadores utilizados son de naturaleza neutral, las variantes únicas encontradas en cada población podrían estar asociadas a variaciones funcionales que podrán explorarse en el futuro.

Sin embargo, debe destacarse que la diversidad alélica total del ovino criollo está particionada entre las diferentes regiones geográficas, variando el N_{am} entre 5,7 en BA y 7,5 en CO, observándose un considerable número de alelos privados (A_p) dentro de cada población. No obstante, estos valores son similares a los registrados en distintas razas como por ejemplo las italianas Cornigliese= 6,64 y Bergamasca= 5,56 o la Merino española= 7,41 (Ceccobelli *et al.*, 2015). La heterocigosidad esperada (H_e) es considerada como el mejor estimador de la diversidad genética en una población (Kim *et al.*, 2002). Los valores de heterocigosidad media esperada en cada población variaron entre 0,63 BA y 0,715 en CO, indicando alta diversidad genética con similares valores a los obtenidos en diez razas de las islas Baleares (rango de 0,62 para la Ibicenca a 0,75 para la Churra) (Pons *et al.*, 2015). Ambos AMOVAS, con y sin estructura poblacional, evidenciaron que la mayor parte de la variación genética total correspondió a diferencias entre individuos (con 91,6 y 92,4%, respectivamente), mientras que las diferencias entre poblaciones explicó poco de la variabilidad total (7,6 y 5,2%, respectivamente). Este grado de diferenciación genética entre las poblaciones fue mayor que el observado en los ovinos criollos colombianos donde la variación genética entre las poblaciones resultó ser de 3,8% (Ascue Vivas, 2013) o entre 13 razas ovinas en Colombia donde las diferencias entre las razas explicaron el 4% de la variación total (Campos *et al.*, 2016). Por otra parte, el análisis del D-loop mitocondrial puso en evidencia que los sitios polimórficos hallados son compartidos con el haplogrupo A (asiático). Esto puede deberse a que este haplogrupo se encuentra presente en varias razas españolas actuales (Pedrosa *et al.*, 2006; Ferrando *et al.*, 2009), cuyos antecesores podrían ser compartidos con los ovinos criollos de nuestro país. La homogeneidad de los ovinos

criollos, manifestada a través del ADN mitocondrial es mayor que la hallada con los microsatélites. Además, es de destacar que las secuencias obtenidas presentaban sitios polimórficos que sólo se presentan con una alta frecuencia en las poblaciones locales. Los resultados obtenidos con diferentes análisis estadísticos (AMOVA y AFC) y los parámetros estudiados (FST, K, Nm, etc.) confirman que la máxima variabilidad genética es explicada por diferencias en los patrones moleculares de los individuos, señalando una alta variación intrapoblacional. Por otro lado, los bajos porcentajes de variación encontrados para la fuentes “Entre poblaciones” y “Entre grupos (Regiones)” presentadas en los AMOVAS con y sin estructura, respectivamente, confirman los resultados encontrados mediante el análisis del ADN mitocondrial. Ello revela cierta homogeneidad entre las poblaciones estudiadas ratificando la pertenencia a la misma agrupación racial. En conclusión, el presente estudio ha contribuido al conocimiento de los ovinos criollos argentinos, destacando la diversidad genética de los mismos y brindando información sobre su estructura poblacional, lo que permitirá encarar diferentes estrategias a la hora de implementar planes de conservación, recuperación y/o mejora, de este valioso recurso genético, según requiera la situación local.

BIBLIOGRAFÍA

- Agaviezor B.O., Peters S.O., Adefenwa M.A., Yakubu A., Adebambo O.A., Ozoje M.O., Ikeobi C.O., Wheto M., Ajayi O.O., Amusan S.A., Ekundayo O.J., Sanni T.M., Okpeku M., Onasanya G.O., Donato M.D., Ilori B.M., Kizilkaya K., Imumorin I.G. (2012) Morphological and microsatellite DNA diversity of Nigerian indigenous sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 3: 38.
- Álvarez I., Capote J., Traoré A., Fonseca N., Pérez K., Cuervo M., Fernández I., Goyache F. (2012) Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Ruminant Research* 104: 89-93.
- Ascue Vivas N.J. (2013) Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordinación general de posgrados Sede Palmira.

- Avellanet Torres Rosa (2006) Conservación de recursos genéticos ovinos en la raza Xisqueta: Caracterización estructural, racial y gestión de la diversidad en programas “in situ”. Tesis doctoral Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Baumung R., Cubric-Curik V., SchwendK., Achmann R., Solkner J. (2006) Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: 265-271.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Calvo J.H., Alvarez-Rodriguez J., Marcos-Carcavilla A., Serrano M., Sanz A. (2011) Genetic diversity in the Churratensina and Churralebrijana endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small Ruminant Research* 95: 34-39.
- Campos R., Cardona H., Martínez R. (2016) Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76 (1): 40-46.
- Carrazoni J.A. (1997) Crónicas del Campo Argentino, nuestras raíces agropecuarias. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Orientación Gráfica Editora SRL, pp. 405.
- Ceccobelli S., Karsli T., Di Lorenzo P., Marozzi G., Landi V., Sarti F.M., Sabbioni A., Lasagna E. (2015) Genetic diversity of Cornigliese sheep breed using STR markers. *Small Ruminant Research* 123: 62-69.
- Coronato F. (2010) Le role de l'élevage ovin dans la construction du territoire de la Patagonie. Autre [q-bio. OT]. *AgroParisTech*, Français. NNT: 2010AGPT pastel-<00593011>.
- Crispim B., Seno de Oliveira L., Alves do Egito A., Miranda de Vargas F., Barufatti Grisolia A. (2014) Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of Pantaneiro sheep. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 317-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.007>.
- De Gea G.A., Levrino G. (2000) La oveja tipo “Criollo” de las Sierras de Los Comechingones. XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), Córdoba, Argentina.
- De la Rosa S.A., Revidatti M.A., Tejerina E.R., Orga A., Capello J.S., Petrina J.F. (2012) Estudio para la caracterización de la oveja criolla en la región semiárida de Formosa, Argentina. *Revista AICA* 2: 87-94.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (1990) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1 (2005): 47-50.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14 (8): 2611-20.
- Ferrando A., Casas M., Marmi J., Parés P.M., Jordana J. (2009) Variabilidad del ADN mitocondrial en cinco razas ovinas pirenaicas. *AIDA XIII Jornadas Españolas sobre Producción Animal*, Tomo I: 48-50.
- Ferrando A., Goyache F., Parés P.M., Carrión C., Miró J., Jordana J. (2014) Genetic relationships between six eastern Pyrenean sheep breeds assessed using microsatellites. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12 (4): 1029-1037.
- Giberti H. (1970) Historia económica de la ganadería argentina. Solar Hachette, Buenos Aires.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* 47 (4): 441-8.
- Kijas J.W., Lenstra J.A., Hayes B., Boitard S., Neto L.R.P., San Cristobal M., Servin B., McCulloch R., Whan V., Gietzen K., Paiva S., Barendse W., Ciani E., Raadsma H., McEwan J., Dalrymple B. (2012) Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels

- of historic mixture and strong recent selection. *PLOS Biology* 10: .
- Kim K.S., Yeo J.S., Choi C.B. (2002) Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics* 33 (3): 201-204.
- Lanari M.R., Reising C., Monzón M., Subiabre M., Killmeate R., Basualdo A., Cumilaf A.M., Zubizarreta J.L. (2012) Recuperación de la oveja Linca en la Patagonia Argentina. *Revista AICA* 2: 151-154.
- Lynch G., Peña S., Mc Cormick M., Simonetti L., Donzelli V., De Gea G., Lanari M., Martínez R. (2009) Recursos genéticos ovinos en la Argentina. En: Delgado Bermejo J.V. (Ed.) Biodiversidad ovina iberoamericana. Universidad de Córdoba, España, pp. 405-432.
- Martínez R.D. (2015) Prejuicios que afectan a bovinos y ovinos criollos en Argentina. *Revista AICA* 5: 26-35.
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J.W. (2007) Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics* 175: 1371-1379.
- Mueller J. (2005) Síntesis de las razas ovinas y su uso en la argentina. Memorias del VII curso de actualización ovina. INTA Bariloche pp. 3-13. www.produccion-animal.com.ar (visitada el 11/11/13).
- Niu L.L., Li H.B., Ma Y.H., Du L.X. (2012) Genetic variability and individual assignment of Chinese indigenous sheep populations (*Ovis aries*) using microsatellites. *Animal Genetics* 43: 108-111.
- Ocampo R., Cardona H., Martínez R. (2016) Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76 (1): 40-47.
- Park S. (2001) Animal Genomics Lab. University College, Dublin, Ireland. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>. Excel Microsatellite Toolkit v. 3.1.
- Pedrosa S., Arranz J., Nuno B., Molina A., San Primitivo F., Bayón Y. (2006) Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet. Sel. Evol.* 39 (1): 91-103.
- Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38: 37-44.
- Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pons A.L., Landi V., Martínez A., Delgado J.V. (2015) The biodiversity and genetic structure of Balearic sheep breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* pp. 1-9.
- Rodero A., Delgado J.V., Rodero E. (1992) Primitive Andalusian Livestock and their implications in the discovery of America. *Arch. Zoot.* 41 (extra)(154): 383-400.
- Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- San Primitivo F., Pedrosa S., Arranz J.J., Brito N.V., Molina A., Bayón Y. (2007) Variabilidad del DNA mitocondrial en razas ovinas ibéricas. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1): 455-460.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) ARLEQUIN. Software for population genetics data analysis. University of Geneva, Switzerland, pp. 111.
- Tapio M., Ozerov M., Tapio I., Toro M.A.M., Marzanovs N., Cinkulov M., Goncharenko G., Kiselyova T., Murawski M., Kantanen J. (2010) Microsatellite-based genetic diversity and population structure of domestic sheep in northern Eurasia. *BMC Genetics*, 76: 1-11.
- Weir B.S., Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Zeballos E. (1898) Descripción Amena de la República Argentina. Tomo III "A través de las cabañas". Editor Jacobo Peuser, La Plata, Argentina.



Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S., Mitchell J.I. (2008) Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (4): 931-41.